# AC133 항원 양성 급성백혈병의 생물학적 특성

국민건강보험공단 일산병원 내과[1], 연세대학교 의과대학 내과학교실[2]

김진석[1] · 맹호영[2] · 정준원[2] · 이승태[2] · 한지숙[2] · 고윤웅[2] · 민유홍[2]

# Biological Characteristics of AC133 Antigen-Positive Acute Leukemia

Jin Seok Kim, M.D.[1], Hoyoung Maeng, M.D.[2], June-Won Cheong M.D.[2], Seung Tae Lee, M.D.[2]
Jee Sook Hahn, M.D.[2], Yun Woong Ko, M.D.[2] and Yoo-Hong Min, M.D.[2]

*Department of Internal Medicine[1], National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital, Goyang,*
*Department of Internal Medicine[2], Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background :** AC133 antigen is a cell surface antigen which is selectively expressed on hematopoietic stem and progenitor cells. It has been reported that AC133 antigen is expressed on the subsets of $CD34^+$ acute leukemia, and occasionally on $CD34^-$ acute leukemia. We investigated the clinical and biological characteristics of AC133 antigen-positive acute leukemia.

**Methods :** Thirty-six adult acute leukemia patients were analyzed using a cut-off criterion of 20% or more gated leukemic blasts expressing the AC133 antigen for $AC133^+$ leukemia. The biological characteristics focused on apoptosis were examined using multicolor flow cytometry and Western blot analysis.

**Results :** AC133 antigen was expressed in 12 cases (33.3%). Eleven of 21 (52.4%) acute myelogenous leukemia (AML) patients and 1 of 15 (6.7%) acute lymphoblastic leukemia patients were positive for AC133 antigen, and the difference was significant. None of the clinical prognostic markers were significantly different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML. Median disease free and overall survival time were not significantly different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML. The expression rate of CD34 was significantly higher in $AC133^+$ AML patients compared to those of $AC133^-$ AML ($P$=0.045). Among the apoptosis-related proteins, the Fas expression on the leukemic blasts was higher in the $AC133^+$ AML ($P$=0.048), but Fas ligand, Bcl-2, caspase-3 expression rates were not significantly different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML. The apoptosis rate was significantly lower in the Ara-C treated $AC133^+$ AML ($P$=0.049), but the apoptosis rates to other apoptosis-inducing agents (doxorubicin, TNF-α) were not different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML cells. We thought that there were some associations between a trend toward higher caspase-3 expression rates and lower Ara-C induced apoptosis rates in the $AC133^+$ AML.

**Conclusion :** There was no significant correlation between AC133 antigen expression and various clinical characteristics of acute leukemia, but the AC133 antigen might provide different biological characteristics including apoptosis from other immature cell surface markers. However, to verify the prognostic usefulness of AC133 antigen and the basis of the biological characteristics of AC133 antigen-positive acute leukemia, further study is needed. *(Korean J Hematol 2002;37:177 190)*

**Key Words :** AC133 antigen, Acute leukemia, Apoptosis

접수 : 2002년 8월 2일, 수정 : 2002년 8월 20일, 승인 : 2002년 8월 25일
책임저자 : 민유홍, 연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel : 02)361-5410, 5438, Fax : 02)393-6884, E-mail : minbrmmd@yumc.yonsei.ac.kr

## 서 론

AC133 항원은 처음에는 $CD34^{bright}$ 조혈모세포에서만 제한되어 표현되는 구조적으로 매우 새로운 5-transmembrane molecule로서, 세포표면에서 이 항원의 표현은 매우 미성숙한 과립구-단구 수임 조혈모세포군임을 시사한다고 알려졌다.[1-3] 즉, AC133 항원은 지금까지 조혈모세포 특이 항원으로 알려진 CD34 항원 양성 조혈모세포 중 특히 미성숙 단계의 조혈모세포에서 특이적으로 표현되는 세포표면 항원임을 의미한다. 그러나, 이후에 AC133 항원은 정상 조혈모세포 뿐만 아니라 CD34 양성 급성백혈병 세포 및 일부 CD34 음성 백혈병세포에서도 표현되며,[4] 아직까지 AC133 항원 양성 급성백혈병의 임상 양상과 면역학적 및 생물학적 특성에 대한 연구는 없다.

조혈모세포 개체발생단계 (ontogeny) 중 어느 시점에서 유래되었는가 하는 사실을 인지하여 백혈병의 생물학적 특성을 예측할 수 있을 것이다. 미성숙 단계에서 발생한 백혈병의 경우 생물학적으로도 역시 더욱 미성숙한 양상을 보여 치료에 대한 반응 및 생존율 등이 저조하고,[5,6] 항암제에 대한 다약제내성유전자 (multi-drug resistance gene)의 발현과도 연관된다.[7] 그러나, 기존의 조혈모세포 특이 항원인 CD34 항원 양성 백혈병의 면역학적 및 생물학적 특성은 연구마다 상이한 결과를 보이며, 이는 CD34 항원 양성 백혈병세포가 이질적인 세포군임을 시사한다. 따라서 CD34 항원 양성 세포군의 일부로 생각되는 AC133 항원 양성 세포를 이용하여 이러한 이질성을 극복할 수 있을 것이다.

급성백혈병에서 항암제의 항백혈병효과는 세포고사 (apoptosis)에 의한 것으로 밝혀진 바 있다. 급성백혈병의 치료실패의 가장 중요한 원인은 약제내성이며, 따라서 세포고사 조절기전의 이상이 이러한 약제내성의 중요한 기전으로 생각된다.[8] 지금까지 백혈병세포의 면역표현형 분석 및 세포고사 연구가 활발히 이루어지고 있는 바, CD34, HLA-DR, CD38 항원 표현형에 따라 백혈병세포의 클론 유래 단계 및 증식, 분화에 있어서의 백혈병세포의 특성을 연관시킨 연구 결과들이 보고된 바 있다. 따라서 AC133 항원 양성 백혈병세포의 면역표현형 분석 및 세포고사 조절기전 연구로 AC133 항원 양성 백혈병세포의 생물학적 특성을 규명할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 저자들은 AC133 항원 표현 여부에 따른 백혈병세포의 면역표현형과 임상양상의 차이를 비교 분석하고, 또한 세포고사 조절기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Fas, Bcl-2, caspase-3 단백의 구조적 표현정도를 측정하며, *in vitro*에서 AC133 항원 양성 백혈병세포의 세포고사 유발 화학물질에 대한 세포고사 유발 반응 정도를 AC133 항원 음성 백혈병세포 및 다른 미성숙세포 표면 항원과 비교 분석하여 급성백혈병에서 AC133 항원의 임상적인 의미와 AC133 항원 양성 백혈병의 생물학적 특징을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1997년 11월부터 2000년 5월까지 혈액종양내과에서 처음 급성백혈병으로 진단 받은 15세 이상의 환자 36례 (급성골수성백혈병 21례, 급성림프구성백혈병 15례)를 대상으로 하였다. 급성백혈병의 진단은 형태와 세포화학염색에 기초를 둔 French-American-British (FAB) 분류에 따라 시행하였다. 급성백혈병으로 진단 당시의 골수 단핵세포 (bone marrow mononuclear cells)를 Ficoll-Hypaque (Nyegaard, Oslo, Norway) 농도차이 (density gradient)를 이용한 분리법으로 분리하였다. 두차례 세척한 뒤에 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Gaithersburg, MD)과 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 포함한 RPMI 1640 배양액 (GIBCO)에 재부유시킨 후에 액화질소에 냉동하여 -70°C에서 보관하였다. 실험은 골수 단핵세포를 녹이고 FBS와 RPMI 1640으로 2번 세척하고 0.3% trypan blue 용액으로 염색한 뒤에 hemocytometer를 이용하여 활성도 (viability)를 측정하여서 활성도가 90% 이상인 것만 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 임상적 특징과의 연관성

급성백혈병 환자의 진단 당시의 나이, 성별, 말초혈액수치, lactate dehydrogenase (LDH), 염색체 변이 및 관해유도 항암치료 이후 골수검사상 완전 관해 판정 유무, 완전관해 유지기간, 1년내 재발 유무, 무병생존기간, 총 생존기간 등 임상적인 특징을 의무기록을 통하여 후향적으로 조사하였다. 급성골수성백혈병과 급성림프구성백혈병으로 나눠서 AC133 항원 표현 유무와 임상적인 특징과의 연관성을 조사하였다. 완전관해는 골수 외 백혈병 (extramedullary leukemia)의 증거가 없으며, 말초혈액에서 호중구가 1,500/μL 이상, 미숙세포 (blast)가 없고, 혈소판이 100,000/μL 이상이며 골수검사 상 세포 충실도 20% 이상, 미숙세포가 5% 미만에서 관찰되는 상태가 적어도 4

주 이상 지속될 때로 정의하였다.

2) **AC133 항원 표현에 따른 면역표현형 검사**

백혈병세포에서 AC133, CD34, CD38, HLA-DR 항원의 표현과 세포고사와 관련된 단백질인 Fas, FasL (ligand)을 측정하기 위하여 각각의 항원에 대한 단클론 항체를 이용한 유세포분석을 시행하였다. 각각의 단클론 항체는 FITC (fluorescent isothiocyanate, FL1)나 PE (phycoerythrin, FL2)나 PerCP (peridinine cholorophyll protein, FL3)와 결합된 것을 사용하거나 purified form을 사용하였다. AC133-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD34-FITC (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), CD38 (Becton Dickinson), HLA-DR-PerCP (Becton Dickinson), Fas (Becton Dickinson), FasL (Becton Dickinson), CD45-FITC (Becton Dickinson)을 사용하였다. 음성 대조로는 mouse $IgG_1$-FITC, mouse $IgG_1$-PE, mouse $IgG_1$-PerCP (Becton Dickinson)을 사용하였다.

유세포분석을 위해서 2.5—5.0×$10^5$ cells/50 μL의 단핵세포를 100 μL FACS wash buffer에 재부유시킨 뒤에 다음과 같은 단클론 항체 조합 (Table 1)에 따라 각각 10 μL 단클론 항체를 넣고 4°C에서 20분간 배양시킨 후 FACS wash buffer 2mL을 넣고 4°C에서 300g로 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 사용하였다.

형광물질이 결합되지 않은 항체인 CD38, Fas, FasL은 RAM (rat anti-mouse) IgG1-PerCP (Becton Dickinson)와 다시 한번 더 4°C에서 20분간 배양하여 분석하였다. 염색된 세포들은 유세포분석기 (FACSCalibur, Becton Dickinson)를 이용하여 forward scatter (FSC)와 side scatter (SSC)지표는 linear scale로, 형광 강도의 검출에는 FITC는 FL1, PE는 FL2, PerCP는 FL3 지표를 log scale로 맞추고 CellQuest software (Becton Dickinson)를 사용하여 각 항원마다 적어도 10,000개의 골수 유핵 세포 분석 결과를 얻어서 분석을 하였다. 실험에 사용된 환자의 전체 세포 중에서 CD45와 SSC를 이용하여 백혈병 세포를 검출한 뒤 여기서 AC133 항원의 표현정도를 측정하였다. 염색된 세포가 대조군과 비교하여 적어도 20% 이상일 때를 양성으로 간주하였다. AC133 양성 백혈병은 CD45와 SSC를 이용하여 측정한 백혈병 세포 중에서 AC133 항원이 대조군과 비교하여 20% 이상 표현될 때로 정의하였다.

Table 1. Monoclonal antibody panel for flow cytometry used in the study

| No | FITC | PE | PerCP |
|---|---|---|---|
| 1 | Control $IgG_1$ | Control $IgG_1$ | Control $IgG_1$ |
| 2 | CD34 | AC133 | CD38 |
| 3 | CD34 | AC133 | HLA-DR |
| 4 | CD34 | AC133 | Fas |
| 5 | CD34 | AC133 | FasL |
| 6 | CD45 | AC133 | |

Abbreviations : FITC, fluorescent isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinine cholorophyll protein; FasL, fas-ligand

3) **Western blot 분석**

급성백혈병 36례의 백혈병세포에서 Western blot 분석을 이용하여 Bcl-2, caspase-3 단백의 표현 정도를 측정하였다. AC133 항원에 따른 급성골수성백혈병에서 이들 단백의 표현에 대한 결과분석은 세포에서 추출한 단백의 농도가 낮아 분석을 시행하지 못한 2례와 급성전골수성 백혈병 (acute promyelocytic leukemia, M3) 2례를 제외한 17례를 대상으로 하였다. 급성백혈병으로 진단 당시의 골수 단핵세포에서 단백을 추출한 후에 측정할 단백을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)위로 단백을 이동시켰다. Anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), anti-caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology)와 ECL chemiluminiscent detection reagent (Amersham)를 사용하였고, 각각의 단백의 표현정도는 CSC Camera controller 1.4 program (Vilber lourmat, France)으로 읽은 뒤에 TINA 2.10e program (Raytest, Germany)을 이용하여 측정하였으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 각각 단백의 표현정도의 차이를 관찰하였다. 대조군으로 anti-human α-tubulin (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada)을 사용하여 α-tubulin을 측정하였다.

4) **화학물질에 의한 세포고사 유도 검사**

급성백혈병 36례 진단 당시의 골수 단핵세포에 세포고사를 유발하는 화학물질 (cytosine arabinoside [Ara-C], doxorubicin, TNF-α)을 첨가하여 세포고사를 유도하였으며, Ara-C 1 μM (24시간), doxorubicin 1 μM (4시간), TNF-α 10ng/mL (4시간)을 사용하였다. 세포고사의 유도정도는 Annexin-V-FITC (Becton Dickinson)/Propidium iodide (PI; Sigma, Deisenhofen, Germany) 염색 후 유세포분석기를 이용하여 분석하였다. 100 μL (1×$10^6$ cells)에 Annexin-V-FITC 5 μL와 PI 10 μL를 첨가하여 염색하였다. 세포고사가 된 세포는 Annexin-V+/PI± 세포로 규정하였다. 세포고사의 정도는 화학물질을 첨가하지 않은 대조군과의 차이를 측정하여 사용하였으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도의 변화를 측정하였다.

5) 화학물질에 의한 세포고사의 형태학적 분석

세포고사를 유발하는 화학물질인 Ara-C 1μM (24시간), doxorubicin 1μM (4시간), TNF-α 10ng/mL (4시간)을 첨가하여 세포고사를 유도하였으며, 화학물질을 첨가하지 않은 대조군과 각각의 화학물질을 첨가한 세포와의 형태학적 차이를 관찰하였다. 24시간 동안 배양을 한 다음 세포염색을 위해서 cytospin centrifuge (Cytospin 3; Shandon, USA)를 시행하였으며, Wright 염색을 하여 현미경 (Olympus BX50F; Olympus optical co, Japan)으로 AC133 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 형태학 변화를 관찰하였다.

6) 통계 분석

AC133 항원 양성 유무에 따른 임상적 특징은 Student's *t*-test로 비교하였고, 생존율은 Kaplan-Meier 생존곡선을 log rank test로 비교하였다. AC133 항원에 따른 면역표현형 검사와 생물학적 특성의 비교는 chi-square test, Student's *t*-test, Pearson correlation test를 사용하였다. 모든 통계 결과는 *P*값이 0.05 미만인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 이상의 모든 통계 분석은 Windows-SPSS release 9.0을 사용하여 수행하였다.

## 결 과

### 1. AC133 항원 표현에 따른 급성백혈병의 임상적 특성

전체 36례 급성백혈병 환자의 남녀 비는 1.6 : 1 (남자 22명, 여자 14명)이었다. 평균 연령은 41.3세 (15 73세)였다. AC133 항원은 12례 (33.3%)에서 양성이었으며, 이들 AC133 항원 양성 급성백혈병 환자에서 백혈병세포 중 AC133 항원의 표현은 중앙값이 65.0% (20.1 91.0%)이었다. 대상환자의 임상적인 특징을 AC133 항원 표현 유무에 따라 요약하였으며, 중앙값을 사용하였다 (Table 2 4).

AC133 항원 양성 급성백혈병은 급성골수성백혈병 21례 중 11례 (52.4%)이었으며, 급성림프구성백혈병 15례 중 1례 (6.7%)이었다. 급성림프구성백혈병보다는 급성골수성백혈병에서 AC133 항원의 표현이 높았다 (*P*=0.005). AC133 항원 양성 급성림프구성백혈병 1례는 형태학적으로는 L2, 면역학적으로는 common B-세포 림프구성백혈병 (CD10 양성)이었으며, 백혈병세포 중 AC133 항원의 표현은 35.3%이었다. 급성골수성백혈병 환자의 임상적 특징을 AC133 항원 표현 유무에 따라 요약하였다 (Table 5). 급성골수성백혈병에서 AC133 항원은 M1에서 100%, M4에서

Table 2. Clinical characteristics and expression rates of AC133 and CD34 antigen in acute myelogenous leukemia

| UPN | Sex/Age | FAB type | AC133 (%) | CD34 (%) | Karyotype | CR1 duration (months) | OS (months) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | F/25 | M4 | 23.0 | 80.3 | Normal | 8 | 11 |
| 2 | M/46 | M4 | 36.0 | 64.3 | 48XY, +21×2 | 10 | 11 |
| 3 | F/18 | M2 | 67.8 | 0.7 | 45XO, -7, +15 | 13 | 14 |
| 4 | M/42 | M2 | 6.4 | 2.1 | 47XY, +8 | 11 | 15 |
| 5 | F/15 | M2 | 7.1 | 58.0 | No mitoses | 0 | 10 |
| 6 | F/58 | M4 | 1.5 | 48.4 | 46XX, t(8;21) | 0 | 3 |
| 7 | M/51 | M3 | 0.3 | 31.2 | 46XY, t(15;17) | 17 | 18 |
| 8 | M/17 | M5 | 64.8 | 74.0 | Normal | 16 | 17 |
| 9 | M/50 | M5 | 20.1 | 26.8 | Normal | 18 | 20 |
| 10 | F/68 | M2 | 51.5 | 58.7 | No mitoses | 3 | 6 |
| 11 | M/35 | M1 | 87.7 | 92.3 | Normal | 0 | 2 |
| 12 | M/42 | M2 | 11.4 | 84.0 | No mitoses | 4 | 10 |
| 13 | M/52 | M5 | 9.5 | 90.9 | 45XY, -8 | 0 | 2 |
| 14 | M/67 | M0 | 65.3 | 46.8 | Normal | 0 | 1 |
| 15 | M/34 | M5 | 1.4 | 0.6 | 49XY, +8, 10, 14 | 3 | 4 |
| 16 | M/59 | M0 | 0.9 | 49.4 | Normal | 0 | 1 |
| 17 | M/73 | M1 | 73.6 | 91.6 | 47XY, +8 | 0 | 1 |
| 18 | M/72 | M5 | 91.0 | 93.6 | 47XY, +8 | 0 | 7 |
| 19 | F/71 | M3 | 1.7 | 5.0 | Normal | 22 | 23 |
| 20 | F/18 | M5 | 2.3 | 1.6 | No mitoses | 27 | 29 |
| 21 | M/56 | M4 | 90.9 | 89.3 | Normal | 2 | 10 |

Abbreviations : FAB, French-American-British; CR1, first complete remission; OS, overall survival duration

Table 3. Clinical characteristics and expression rates of AC133 and CD34 antigen in acute lymphoblastic leukemia

| UPN | Sex/Age | FAB type | AC133 (%) | CD34 (%) | Karyotype | CR1 duration (months) | OS (months) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | M/39 | L2 | 3.3 | 91.2 | 46XY, t(9;22) | 7 | 11 |
| 2 | F/15 | L2 | 5.7 | 4.7 | Normal | 4 | 12 |
| 3 | F/18 | L2 | 0.8 | 68.1 | No mitoses | 5 | 8 |
| 4 | F/26 | L2 | 3.9 | 80.4 | Normal | 9 | 20 |
| 5 | M/45 | L2 | 2.0 | 2.0 | Normal | 4 | 12 |
| 6 | M/43 | L2 | 35.3 | 94.3 | No mitoses | 1 | 9 |
| 7 | F/17 | L2 | 1.0 | 1.8 | Normal | 17 | 18 |
| 8 | M/59 | L2 | 1.4 | 0.3 | Normal | 13 | 14 |
| 9 | M/24 | L2 | 10.1 | 9.8 | 47XY, +16 | 11 | 13 |
| 10 | F/36 | L2 | 0.9 | 78.6 | Normal | 12 | 13 |
| 11 | M/27 | L2 | 2.6 | 21.8 | 47XY, +10 | 4 | 10 |
| 12 | F/37 | L2 | 0.3 | 79.5 | No mitoses | 6 | 7 |
| 13 | F/42 | L2 | 0.2 | 48.4 | Normal | 0 | 4 |
| 14 | M/45 | L2 | 1.1 | 89.3 | Normal | 4 | 5 |
| 15 | M/45 | L2 | 9.4 | 91.9 | Normal | 0 | 11 |

Abbreviations : see Table 2

Table 4. Patients characteristics according to AC133 expression

| | AC133 expression | | *P* |
|---|---|---|---|
| | Positive (N=12) | Negative (N=24) | |
| Age | 48 (17 73) | 40.5 (15 71) | NS |
| Sex (M:F) | 9 : 3 | 13 : 11 | NS |
| AML | | | |
| M0/M1/M2/M3 | 1/2/2/0 | 1/0/3/2 | |
| M4/M5 | 3/3 | 1/3 | |
| ALL (L2) | 1 | 14 | |
| Hemogram | | | |
| Hemoglobin (g/dL) | 7.6 (4.2 12.0) | 7.8 (2.8 13.0) | NS |
| WBC ($\times 10^9$/L) | 42.9 (2.7 341.5) | 16.3 (1.3 109.2) | NS |
| Platelets ($\times 10^9$/L) | 53.0 (9.0 139.0) | 54.0 (8.0 512.0) | NS |
| LDH* (IU/L) | 713.5 (250.0 4672.0) | 1423.0 (344.0 13570.0) | NS |

*Normal range; 225 445 IU/L
Abbreviations : AML, acute myelogenous leukenia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; LDH, lactate dehydrogenase; NS, non-significant

75%, M0에서 50%, M5에서는 50%에서 표현되었으며, 급성전골수성 백혈병 (M3) 2례에서는 AC133 항원의 표현은 없었다 (Table 2).

### 2. AC133 항원 표현에 따른 치료결과와 생존율

AC133 항원 표현 유무에 따른 치료결과와 생존율은 급성골수성백혈병과 급성림프구성 백혈병의 임상 경과가 다르므로 각각의 치료결과와 생존율을 분석하였다. AC133 항원 양성 급성림프구성백혈병 1례는 VPD (vincristine, prednisolone, daunorubicin) 항암화학요법 시행 후 완전관해에 도달하였으나 1달 뒤에 재발하였으며, 전체 생존기간은 10개월이고 무병 생존기간은 6개월이었다. 급성골수성백혈병 21례의 치료결과와 생존율은 AC133 항원 표현 유무에 따라 분석하였다 (Table 6).

급성골수성백혈병 환자 중 15례에서는 관해유도 항암제로 Ara-C 100mg/$m^2$을 1일부터 7일까지, idarubicin 12 mg/$m^2$을 1일에서 3일까지 사용하였으며 이중 11례에서 완전관해에 도달하였다. 급성전골수성백혈병 2례는 all-tans retinoic acid (ATRA)로 완전관해에 도달하였다. 관해유도 항암제로 Ara-C, idarubicin, topotecan의 병합요법을 시행한 1례는 완전관해에 도달하지 못하였으며, 3례는 치료 전 조기사망 하였다.

급성골수성백혈병 환자의 전체 생존기간의 중앙값은 10

Table 5. Clinical characteristics of acute myelogenous leukenia patients according to AC133 expression

| | AC133-positive (N=11) | AC133-negative (N=10) | *P* |
|---|---|---|---|
| Age | 50.0 (17 73) | 46.5 (15 71) | NS |
| Sex (M:F) | 8:3 | 6:4 | NS |
| Hemogram | | | |
| Hemoglobin (g/dL) | 7.6 (4.9 13.7) | 6.9 (5.0 12.3) | NS |
| WBC ($\times 10^9$/L) | 28.6 (2.7 341.5) | 18.6 (1.4 45.7) | NS |
| Platelets ($\times 10^9$/L) | 41.0 (9.0 139.0) | 24.5 (8.0 116.0) | NS |
| LDH (IU/L) | 663.0 (250.0 4,672.0) | 1,537.5 (480.0 4,232.0) | NS |
| % AC133 positive | 65.3 (20.1 91.0) | 2.0 (0.3 11.4) | <0.01 |
| Karyotype | | | |
| Normal | 6 | 2 | |
| t(8:21) or t(15:17) | 0 | 2 | |
| +8 or +21 | 3 | 2 | |
| -5 or -7 | 1 | 0 | |
| Others | 0 | 1 | |
| Not reportable | 1 | 3 | |

Table 6. Therapeutic outcomes in acute leukemia patients

| | AML | | | ALL |
|---|---|---|---|---|
| | AC133-positive | AC133-negative | *P* | |
| CR rate (%) | 63.6 (7/11) | 60.0 (6/10) | NS | 86.7 (13/15) |
| CR1 duration (months) | 10.0 | 14.0 | NS | 6.0 |
| Remission failure rate (%) | 36.4 (4/11) | 40.0 (4/10) | NS | 13.3 (2/15) |
| Early death | 25.0 (1/4) | 50.0 (2/4) | | 0.0 (0/2) |
| Resistance | 75.0 (3/4) | 50.0 (2/4) | | 100.0 (2/2) |
| Relapse rate (%) | 42.9 (3/7) | 50.0 (3/6) | NS | 53.8 (7/13) |
| One-year relapse rate (%) | 42.9 (3/7) | 33.3 (2/6) | NS | 53.8 (7/13) |
| Median OS (months) | 10.0 | 10.0 | NS | 11.0 |
| One-year survival rate (%) | 45.5 | 46.7 | | |
| NS | 41.7 | | | |
| Median DFS (months) | 10.0 | 14.0 | NS | 6.0 |

Abbreviations : see Table 2, 3

개월이었으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 생존기간의 차이는 없었다. AC133 항원 양성 급성골수성백혈병 환자의 생존율이 AC133 항원 음성 환자보다 낮은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다 (Fig. 1).

AC133 항원 양성 골수성백혈병 환자의 첫번째 관해유지기간이 AC133 항원 음성 환자보다 짧은 경향이고, 1년 재발률은 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 6).

CD34 항원 표현 유무에 따른 생존율은 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병 환자에서 통계 유의하게 낮았다 ($P<0.01$). 그러나, AC133 양성/CD34 양성 급성골수성백혈병 환자와 AC133 음성/CD34 양성 급성골수성백혈병 환자의 생존율은 차이가 없었다. 그리고, CD38 항원과 HLA-DR 항원의 표현에 따른 생존율의 차이도 없었다.

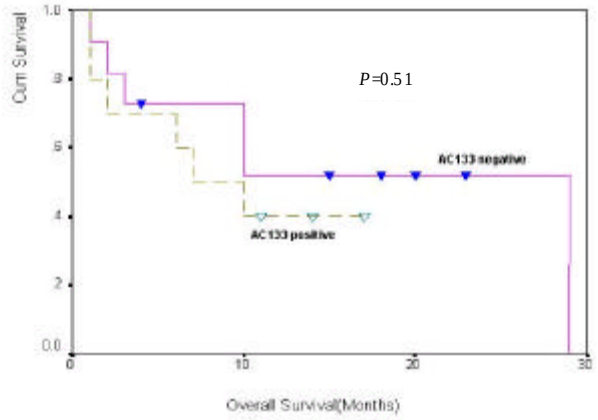
### 3. AC133 항원과 CD34, CD38, HLA-DR 항원 표현과의 연관성

급성백혈병 환자의 골수 단핵세포에서 AC133 항원 표현에 따른 CD34, CD38, HLA-DR 항원의 표현정도를 유세포분석을 통하여 분석하였다 (Fig. 2).

급성림프구성백혈병 15례 중 CD34 항원 양성은 10례 (66.7%), CD38 항원 양성은 15례 (100%), HLA-DR 항원 양성은 12례 (80.0%)이었다. AC133 항원 양성 급성림프구성백혈병 1례는 CD34, CD38, HLA-DR 모두 양성으로 나타났다.

급성골수성백혈병 21례 중 CD34 항원 양성은 15례 (71.4%), CD38 항원 양성은 18례 (85.7%), HLA-DR 항원 양성은 19례 (90.5%)이었다. 급성골수성백혈병 환자에

서 AC133 항원 양성 유무에 따른 이들 항원의 표현은 CD34 항원만 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성 급성 골수성백혈병 환자에서 더 높게 표현이 되었다 ($P$=0.045) (Table 7). CD34 항원 양성 급성골수성백혈병 15례 중 AC133 양성 ($AC133^+$ / $CD34^+$)은 10례 (66.7%)이었으며, $AC133^-$ / $CD34^+$인 경우가 5례 (33.3%)이었다. AC133 항원 양성인 나머지 1례는 $AC133^+$ / $CD34^-$이었다.




leukemia patients according to AC133 expression.

AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 AC133 항원 양성 세포 중 AC133 항원과 CD34 항원을 동시에 표현하는 세포가 차지하는 비율은 99.0% (중앙값)이었으며, AC133 항원과 CD38 항원을 동시에 표현하는 세포는 76.5%, AC133 항원과 HLA-DR 항원을 동시에 표현하는 세포는 94.1%이었다.

### 4. AC133 항원 표현에 따른 세포고사와 관련된 단백의 표현 특성

급성백혈병 환자의 골수 단핵세포에서 AC133 항원 표현에 따른 세포고사와 관련된 단백인 Fas, FasL 단백의 표현 정도를 검사하기 위하여 유세포분석을 시행하였고 (Fig. 2), Bcl-2, caspase-3 단백의 표현정도는 Western blot으

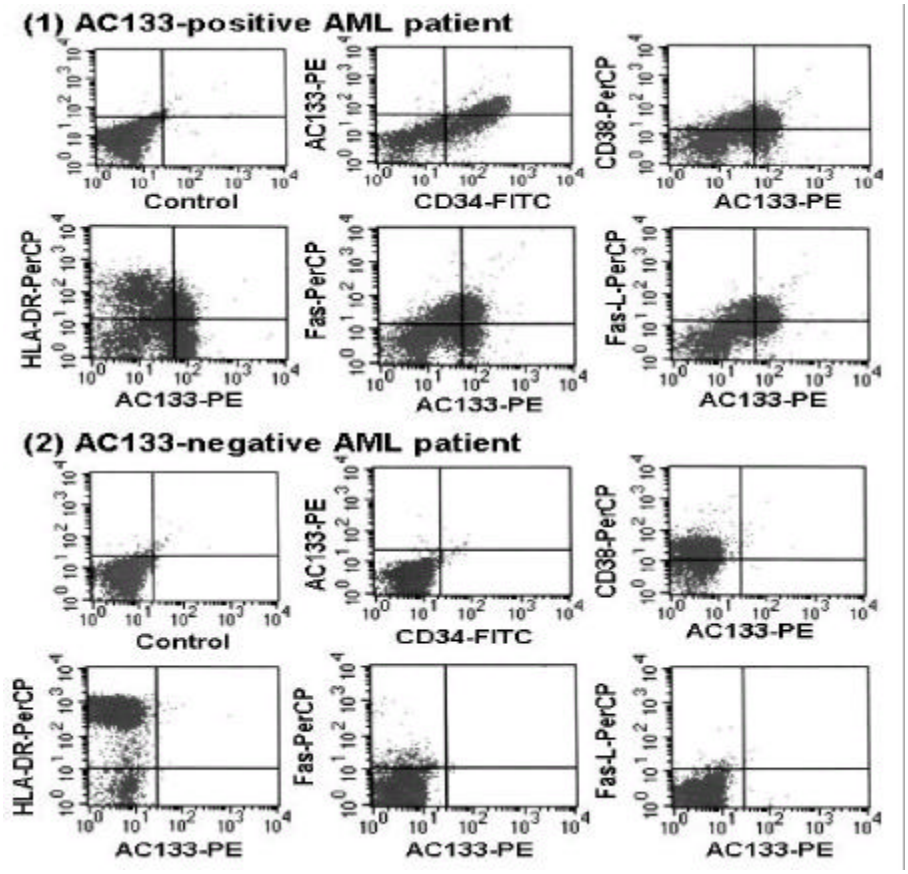



**Fig. 2.** Coexpression of AC133, CD34, CD38, HLA-DR, Fas, FasL (ligand) in (1) AC133-positive and (2) AC133-negative acute myelogenous leukemia (AML) cells. Flow cytometric analyses of immunophenotypes of AML cells obtained from two representative cases are shown.

로 분석하였다 (Fig. 3).

급성림프구성백혈병 중에서는 Fas 항원 양성은 9례 (60.0%), FasL 항원 양성은 9례 (60.0%)이었다. AC133 항원 양성 급성림프구성백혈병 1례는 Fas (91.9%), FasL (89.9%) 모두 양성이었다. Bcl-2, caspase-3의 표현정도는 흡광도 (OD, optical density)로 정량화 하였으며, AC133 항원 양성 급성림프구성백혈병 1례는 Bcl-2와 caspase-3 단백의 표현정도는 모두 평균값 이상이었다.

급성골수성백혈병 21례 중 Fas 항원 양성은 12례 (57.1%), FasL 항원 양성은 11례 (52.4%)이었다. 급성골수성백혈병 환자에서 AC133 항원 양성 유무에 따른 Fas, FasL 단백의 표현정도는 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병 환자에서 더 높은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다 (Table 8).

급성골수성백혈병 17례에서 Western blot 분석을 통한 Bcl-2, caspase-3 단백의 표현정도는 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 Bcl-2의 표현은 더 낮고, caspase-3의 표현은 더 높은 경향을 보였으나, AC133 항원 양성 유무에 따른 이들 Bcl-2, caspase-3 단백의 표현정도는 통계적으로는 차이가 없었다 (Fig. 4).

급성골수성백혈병 환자에서 CD45와 SSC를 이용하여 측정한 백혈병세포에서 AC133 항원 표현정도와 Fas의 표현정도와의 연관성은 통계적으로 의미 있게 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 높게 나타났다 (Pearson correlation, $P$=0.048). 그러나, 다른 세포고사 관련 단백인 FasL, Bcl-2, caspase-3의 표현정도는 AC133 항원의 표현정도와 관련성을 나타내지 않았다.

급성골수성백혈병에서의 Fas, FasL의 표현정도는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 높게 나타났다 ($P$<0.001). 그러나, CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 Bcl-2의 표현정도는 낮은 경향을 보였고, caspase-3의 표현정도는 높은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다. CD34 항원 양성 급성골수성백혈병 중에서 $AC133^+/CD34^+$ 급성골수성백혈병과 $AC133^-/CD34^+$ 급성골수성백혈병간에 세포고사와 관련된 단백인 Fas, FasL, Bcl-2, caspase-3의 표현은 Fas, FasL은 $AC133^+/CD34^+$ 급성골수성백혈병에서 높은 경향을 보였고, Bcl-2, caspase-3는 $AC133^+/CD34^+$ 급성골수성백혈병에서 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다.

### 5. AC133 항원 표현에 따른 세포고사 유도 결과

급성골수성백혈병에서 AC133 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도를 Annexin-V-FITC/PI 염색 후 유세포분석으로 분석하였다 (Fig. 5). 급성골수성백혈병에서 AC133 항원에 따른 세포고사의 정도는 세포고사를 유발하는 화학물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 분석한 결과 Ara-C를 사용한 경우에는 AC133 항원 양성 세포에서 세포고사의 정도가 더 낮게 나왔다 ($P$=0.049). 그러나, doxorubicin, TNF-α를 사용한 경우에서는 AC133 항원 양성

Table 7. Immunophenotype in AC133-positive and AC133-negative AML cells

| | AC133-positive (N=11) | AC133-negative (N=10) | *P* |
|---|---|---|---|
| CD34 (%) | 65.3±30.2 | 34.1±36.3 | 0.045 |
| CD38 (%) | | | |
| HLA-DR (%) | | | |

Table 8. Coexpression of Fas and Fas ligand proteins according to AC133 expression in AML cells

| | AC133-positive (N=11) | AC133-negative (N=10) | *P* |
|---|---|---|---|
| Fas (%) | 39.3±26.1 | 19.1±21.3 | NS |
| Fas ligand (%) | 41.2±30.9 | 22.7±26.5 | NS |

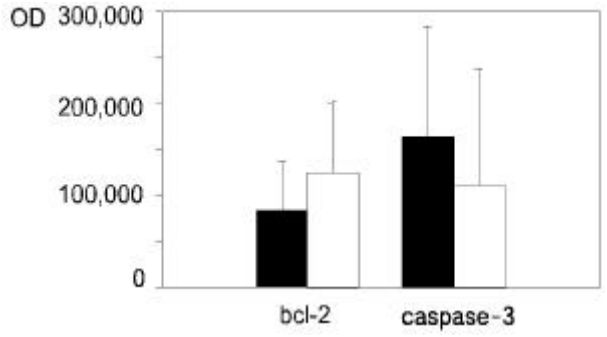



**Fig. 4.** Expression of bcl-2, caspase-3 in AC133-positive (closed bars) and AC133-negative AML cells (open bars). Abbreviation : OD; optical density.

급성골수성백혈병에서 세포고사의 정도가 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다 (Table 9).

CD34 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도는 doxorubicin, TNF-α를 사용한 경우에서는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 세포고사의 정도가 유의하게 더 낮았으나 (doxorubicin ; $P$=0.015, TNF-α ; $P$=0.011), Ara-C를 사용한 경우에는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 세포고사의 정도가 낮은 경향이나 유의하지 않았다.

AC133 항원 유무에 따른 세포고사의 형태학적 변화를 관찰하였다 (Fig. 6). 염색질이 모이고 농축되며, 핵이 조각나고, 농축된 호염기성의 세포질을 가진 세포고사의 전형적인 형태소견이 관찰되었고, AC133 항원 표현 유무나 세포고사를 유발하는 화학물질에 따른 세포고사의 형태학

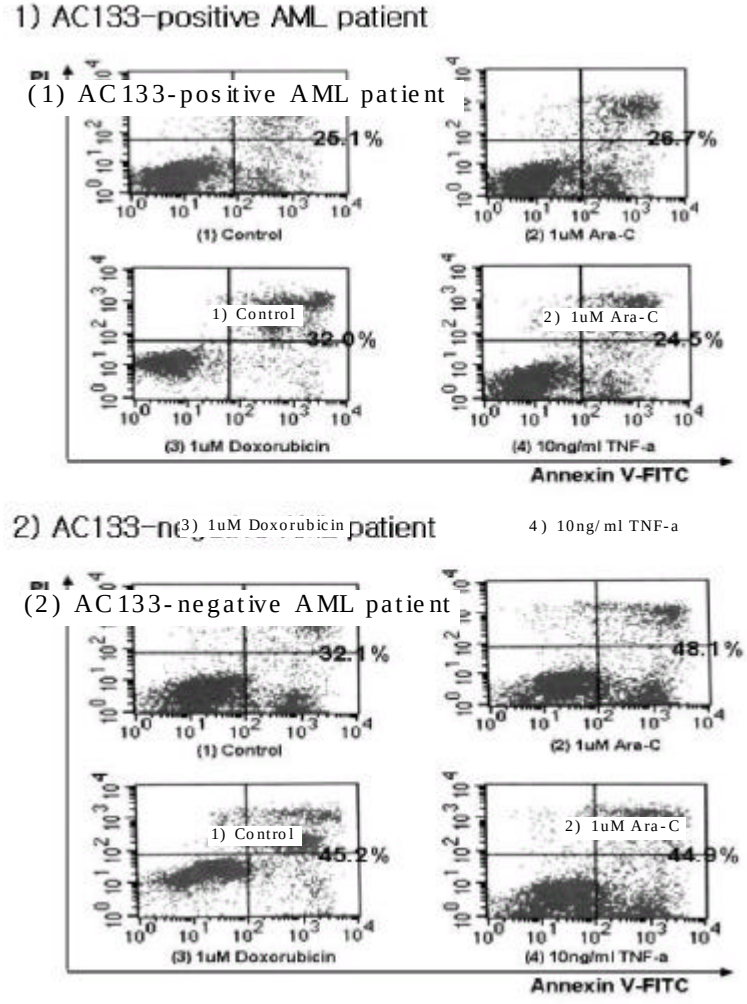



**Fig. 5.** Dual color analysis of apoptosis in (1) AC133-positive and (2) AC133-negative AML cells (representative cases). (1) Untreated control cells. (2) Cells treated with 1μM Ara-C for 24hrs. (3) Cells treated with 1μM doxorubicin for 4hrs. (4) Cells treated with 10ng/mL TNF-α for 4hrs.

적 변화는 차이가 없었다.

## 고 찰

급성백혈병에서의 AC133 항원 표현의 임상적인 의의에 관련된 보고는 있으나,[1-4] 세포고사와의 연관성에 대한 보고는 없다. 본 연구의 전체 급성백혈병 환자 36례 중 33.3%에서 AC133 항원 양성이었으며, 급성골수성백혈병에서는 52.4%, 급성림프구성백혈병에서는 6.7%에서 AC133 항원 양성이었다. Buhring 등[4]의 급성백혈병 32례의 AC133 항원의 표현연구에서 전체 급성백혈병에서는 78%, 급성골수성백혈병에서는 87%, 급성림프구성백혈병에서는 56%에서 AC133 항원이 양성이었다. 본 연구에서는 Buhring 등[4]의 결과보다는 AC133 항원 양성률이 떨어지나, 급성골수성백혈병과 급성림프구성백혈병에서 모두 표현이 됨을 확인할 수 있었고, 급성림프구성백혈병보다는 급성골수성백혈병에서 더 많이 표현됨을 확인할 수 있었다. CD34 항원이 미성숙한 세포형태(M0, M1, M4)에서 높게 표현되고,[6] 본 연구에서도 AC133 항원 역시 이들 미성숙 세포형태에서 더 많이 표현되는 경향을 보이므로 AC133 항원의 표현이 FAB 분류에 다른 차이가 있는지를 확인하기 위해서 더 많은 급성골수성백혈병 환자를 대상으로 하는 연구가 필요하다.

Table 9. Percentage of apoptosis according to AC133 expression in AML cells

| | AC133-positive (N=11) | AC133-negative (N=10) | *P* |
|---|---|---|---|
| Ara-C (%) | 34.8±6.3 | 39.7±4.2 | 0.049 |
| Doxorubicin (%) | 40.7±7.1 | 45.4±3.2 | NS |
| TNF-α (%) | 34.7±1.6 | 36.6±4.0 | NS |

Abbreviations : Ara-C, cytosine arabinoside; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha

본 연구에서는 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병 환자에서는 CD34 항원의 표현이 높으며, AC133 항원이 CD34 양성 급성백혈병 세포 및 일부 CD34 음성 백혈병세포에서도 표현된다는 Buhring 등[4]의 결과($AC133^+/CD34^+$ ; 70%, $AC133^-/CD34^+$ ; 9%, $AC133^+/CD34^-$ ; 17%)를 확인하였다. CD34 항원 양성 급성골수성백혈병은 치료결과와 예후가 나쁘다고 하나,[5,6] 본 연구에서는 AC133 항원 표현 유무에 따른 생존율은 차이가 없었으며, $AC133^+/CD34^+$ 급성골수성백혈병 환자와 $AC133^-/CD34^+$ 급성골수성백혈병 환자의 생존율도 차이가 없었다. Horn 등[3]의 30례의 급성골수성백혈병 환자에서도 AC133 항원 양성 환

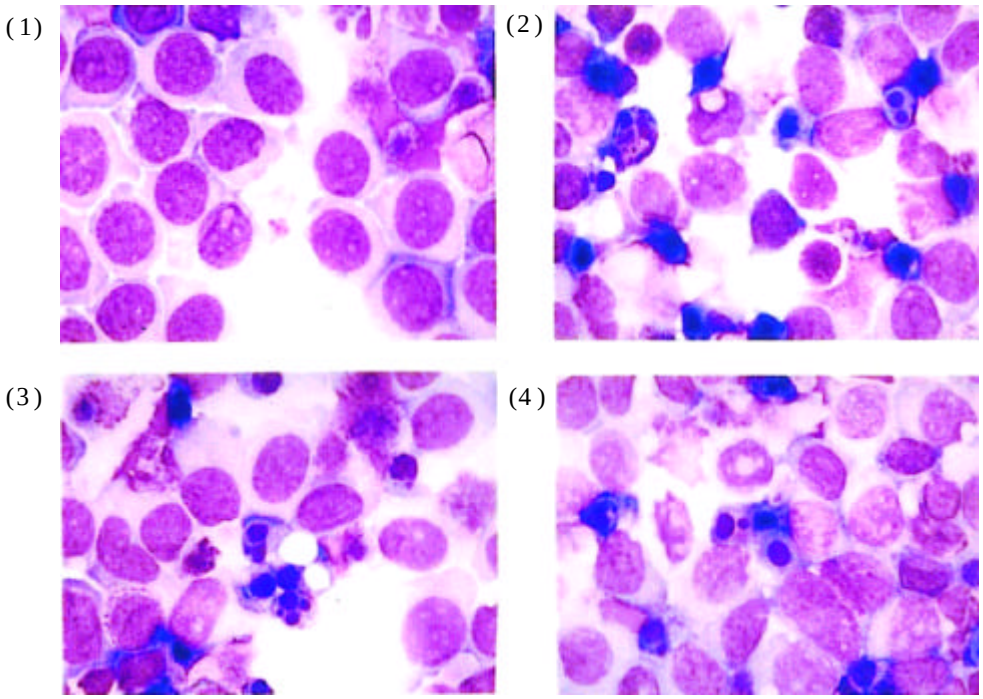



**Fig. 6.** Light microscopic findings of apoptotic AC133-positive AML cells (Wright's stain, × 1,000). (1) Untreated control cells. (2) Cells treated with 1μM ara-C for 24hrs. (3) Cells treated with 1μM doxorubicin for 4hrs. (4) Cells treated with 10ng/mL TNF-α for 4hrs.

자의 완전 관해율이 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었으며, 본 연구에서도 완전 관해율의 차이는 없었고, AC133 항원 양성 골수성백혈병 환자의 첫번째 관해유지기간이 AC133 항원 음성 환자보다 짧은 경향을 보였고, 1년 재발률은 높은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 본 연구에서 급성백혈병에서 예후인자로 사용되던 진단 시 백혈구수, LDH 값, 나이 등[10]은 AC133 항원 표현 유무에 따른 차이를 보이지 않았다.

염색체는 급성백혈병의 예후의 중요인자로, 특히 Grimwade 등[11]은 급성골수성백혈병에서 복잡한 핵형, -5, -7, 3q의 이상소견을 보이는 경우는 불량한 예후를, +8, +21, +22, 정상 염색체는 중간정도의 예후를, t(8;21), t(15;17), inv(16)인 경우에는 좋은 예후를 보인다고 하였다. 본 연구에서 염색체에 따른 세 집단간에 생존율의 차이는 보이지 않았으며, AC133 항원 양성 급성골수성 백혈병 환자에서 불량한 예후를 보이는 염색체가 많은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다.

HLA-DR 항원 양성 급성골수성백혈병은 불량한 예후를 보이며,[12] CD38 항원 양성 급성골수성백혈병은 CD38 항원 음성에 비하여 생존율이 높다.[3] 특히 $CD34^+/CD38^-$ 급성골수성백혈병은 항암화학요법에 대한 민감도가 떨어지는 것으로 보고하고 있다.[14, 15] 본 연구에서는 CD38 항원과 HLA-DR 항원의 표현은 각각 85.7%, 90.5%이었고 각 항원에 따른 생존율의 차이는 없었으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 이들 항원의 표현에도 차이가 없었다. 그리고, AC133 항원 양성 급성골수성 백혈병에서 대부분 하나의 AC133 항원 양성 백혈병 세포에서 CD34, CD38, HLA-DR 항원을 같이 표현하였다.

Fas와 FasL 단백은 세포고사에 관여하는 단백으로 급성백혈병에서 이들 단백의 표현이 많은 경우에는 Fas/FasL 경로를 통한 세포고사가 증가하며 항암제(doxorubicin, etoposide, cisplatin)의 항백혈병효과도 Fas/FasL 경로의 활성화에 의한 세포고사에 의한다.[16, 17] 그리고, 급성골수성백혈병에서 Fas 항원의 표현이 높을 수록 완전관해율이 높다.[18] 본 연구에서는 급성골수성백혈병 환자에서 백혈병 세포 중에서 AC133 항원 표현정도가 높을 수록 Fas의 표현정도가 높았으며($P$=0.048), FasL 표현도 높은 경향을 보였으나 통계적으로 차이가 없었다. 급성골수성백혈병에서 CD34 항원과 Fas, FasL의 표현정도는 관련이 없다는 보고[19]도 있으나, 본 연구에서는 CD34 항원의 표현이 높을 수록 Fas, FasL의 표현이 높았다.

그러나, $AC133^+/CD34^+$ 급성골수성백혈병 환자와 $AC133^-/CD34^+$ 급성골수성백혈병 환자간에는 Fas, FasL의 표현정도는 차이가 없었다. 그러므로, AC133 항원과 관련되어서 Fas의 표현정도가 높았던 것이 아니고 AC133 항원 양성일 수록 CD34 항원의 표현이 많았기 때문에 Fas 단백의 표현이 높았던 것으로 생각된다. $CD34^+/CD38^-$ 급성골수성백혈병에서는 Fas 단백의 표현이 적고 Fas 단백에 의한 세포고사가 적으며 항암화학요법에 저항을 보이며,[14, 15] 본 연구의 대상환자는 급성전골수성백혈병 2례를 제외하면 급성골수성백혈병 환자의 94.7% (18례/19례)에서 CD38 항원 양성으로 대부분 $CD34^+/CD38^-$이 아닌 환자를 대상으로 한 연구 결과이므로 Fas, FasL의 표현이 높았던 것으로 생각된다. 그리고, 본 연구의 결과에서는 자료를 보여주지 않았지만 CD38 항원 표현 유무에 따른 Fas의 표현정도도 의미 있게 CD38 양성 급성골수성백혈병 환자에서 높았으며($P$<0.01), FasL의 표현정도는 CD38 양성 급성골수성백혈병 환자에서 높은 경향을 보였으나 통계적 차이는 없었다($P$=0.56).

급성백혈병에서 Fas, FasL 이외에 세포고사와 관련된 단백 중에서 Bcl-2계 단백(Bcl-2, Bcl-X, Bcl-$X_L$, Bcl-$X_S$, BAX, BAD, MCL-1)과 IL-1 전환 효소 관련 단백[interleukin-1 converting enzyme (ICE)-related proteins; ICE, CPP32 (caspase-3), ICH-1 (caspase-2)]이 대표적이며[20] Bcl-2 단백의 표현이 증가된 경우는 완전관해율과 생존율에 있어서 독립적인 불량한 예후인자로 보고되며, CD34 양성률과 연관성이 있다.[21] 이는 Bcl-2 단백의 표현이 높은 백혈병이 더 미분화된 백혈병이라는 증거가 될 수 있으며, AC133항원 역시 미분화된 백혈병에서 표현되는 항원이므로, AC133 항원의 양성률과 Bcl-2 단백의 표현과의 연관성은 높을 것으로 생각하였다. 그러나, 본 연구에서는 급성골수성백혈병에서 Bcl-2 단백의 표현이 AC133 항원 표현에 따른 차이를 보이지 않았고, CD34 항원과도 그 표현정도가 연관성이 없었으며, $AC133^-/CD34^+$ 급성골수성백혈병보다는 $AC133^+/CD34^+$ 급성골수성 백혈병에서 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 보이지 않았다.

Caspase-3 단백은 전효소(proenzyme)의 형태로 합성되는 물질로 분리되어 생물학적으로 활성화된 형태가 되면 DNA-repair enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)와 같은 세포를 보호하는 물질을 파괴하여서 세포고사를 유도하게 된다.[22] 그리고 Ara-C, etoposide, mitoxantrone과 같은 항암제는 caspase-3의 활성화를 유도하여 백혈병세포의 세포고사를 유도한다.[22, 23] 급성골수성백혈병에서 caspase-3의 표현이 높을 수록 예후가 나쁘며, 특히 중간정도나 좋은 예후를 보이는 염색체를 가진 경우에는 분리되지 않은 형태의(uncleaved) caspase-3의 표현이 높을 수록 생존율이 감소한다.[22] 본 연구에서는 AC133

항원 양성 급성골수성백혈병에서 분리되지 않은 형태의 caspase-3의 표현은 더 높은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 또한, caspase-3의 표현정도는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서도 높은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었고, $AC133^{+}$/ $CD34^{+}$과 $AC133^{-}$/ $CD34^{+}$ 급성골수성백혈병간에서도 차이는 없었다.

Ara-C는 caspase-3의 활성화에 의한 DNA 합성억제를 유발하여 세포고사를 유도한다.[23 25] 본 연구에서 Ara-C를 사용한 경우에는 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 보다 음성에서 더 높은 정도의 세포고사를 보였으며, 이러한 현상은 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 caspase-3의 표현이 높은 경향을 보였던 결과와 연관이 있을 것으로 생각된다. 즉 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서는 분리되지 않은 형태의 caspase-3 단백의 표현이 높으며 Ara-C에 의한 caspase-3의 활성화에 저항을 보였기 때문에 Ara-C에 의한 세포고사가 낮았던 것으로 생각할 수 있다. 또한, 분리되지 않은 형태의 caspase-3의 표현이 많을 수록 불량한 예후를 보이므로[22] 더 많은 환자를 대상으로 하는 연구를 하여 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 분리되지 않은 caspase-3의 표현이 AC133 항원 음성보다 통계적으로 높음을 확인하면 AC133 항원이 불량한 예후를 보이는 원인을 확실히 증명할 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서는 Ara-C에 의한 세포고사가 음성 보다 낮은 경향이나 통계적인 차이는 없어서 AC133 항원이 CD34 항원과 생물학적 특성에서 차이를 보이는 세포표면 항원임을 확인 할 수 있다.

Doxorubicin은 topoisomerase II 억제제로 작용하여 DNA에 손상을 주며, reactive oxygen species (ROS)를 생성하여 강력한 세포독성을 유발한다.[26] 급성백혈병에서 doxorubicin은 Fas/FasL 경로를 통한 세포고사를 유발한다.[16, 17, 27] 본 연구에서 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 doxorubicin에 의한 세포고사의 정도가 AC133 항원 음성보다 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었고, CD34 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 더 낮았다 ($P$=0.015).

TNF-α는 Fas 단백 표현의 증가를 유도하여 세포고사를 유도하는 화학물질이다.[28] 본 연구에서 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 TNF-α에 의한 세포고사의 정도가 AC133 음성보다 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었고, CD34 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 더 낮았다. 최근에는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병에서 TNF-α에 의한 세포고사에 저항을 보이는 것을 NF-kappaB의 활성화로 설명하고 있다.[29] AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서는 CD34 항원 양성 급성골수성백혈병과는 다르게 doxorubicin이나 TNF-α에 의한 세포고사 정도가 차이가 없어서 AC133 항원은 Fas/FasL 경로와 연관된 세포고사와는 관련이 없을 가능성이 있다.

결론적으로 AC133 항원의 표현 유무에 따른 임상적인 차이는 없지만, AC133 항원의 세포고사를 포함하는 생물학적 특성이 다른 미성숙세포 표면 항원과 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, AC133 항원 양성 백혈병의 이러한 생물학적 특성의 원인을 확실히 증명하고 CD34 항원과는 구별되는 임상적인 예후인자로 AC133 항원을 사용하기 위해서는 AC133 항원에 특이한 신호전달경로(signal transduction pathway)와 더 많은 환자를 대상으로 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

## 요 약

**배 경** : AC133 항원은 조혈모세포와 전구세포에서만 제한되어 표현되는 세포 표면 항원이다. 이 AC133 항원은 CD34 양성 급성백혈병 세포 및 일부 CD34 음성 백혈병세포에서도 표현되는 것으로 알려지고 있다. AC133 항원 양성 급성백혈병의 임상 양상과 면역학적 및 생물학적 특성을 연구하였다.

**방 법** : 처음 진단된 성인 급성백혈병 환자 36례 ( 골수성 21례, 림프구성 15례)를 대상으로 하였고, AC133 항원을 표현하는 백혈병 세포가 20% 이상인 경우를 AC133 항원 양성 급성백혈병으로 정의하였다. AC133 항원 표현에 따른 세포고사에 초점을 둔 생물학적 특성을 유세포분석과 Western blot 분석을 사용하였다.

**결 과** : AC133 항원은 12례 (33.3%)에서 양성이었으며, AC133 항원은 급성골수성백혈병 중에서 52.4% (11례/ 21례)이었으며, 급성림프구성백혈병 중에서는 6.7% (1례/ 15례)가 양성이었다. 급성골수성백혈병 중에서 AC133 항원 유무에 따른 임상적인 차이는 없었다. AC133 항원 표현 유무에 따른 급성골수성백혈병 환자의 전체생존기간이나 생존율은 차이가 없었다. CD34 항원은 AC133 항원 음성 급성골수성백혈병 환자보다 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병 환자에서 더 높게 표현이 되었다 ($P$=0.045). 급성골수성백혈병 환자에서 백혈병 세포 중에서 AC133 항원 표현 정도와 Fas의 표현정도와의 연관성은 통계적으로 의미있게 AC133 항원 양성 급성골수성 백혈병에서 높게 나타났다 ($P$=0.048). 그러나, 다른 세포고사 관련 단백인 Fas ligand, Bcl-2, caspase-3의 표현정도는 AC133 항원의 표현과 관련이 없었다. 급성골수성백혈병에서 AC133 항원에

따른 세포고사의 정도는 Ara-C를 사용한 경우에는 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성에서 세포고사의 정도가 더 낮게 나왔으나 ($P$=0.049), doxorubicin, TNF-α를 사용한 경우에서는 통계적으로는 차이가 없었다. 분리되지 않은 형태의 caspase-3의 표현이 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 높은 경향을 보인 것과 AC133 항원 양성 급성골수성백혈병에서 Ara-C에 의한 세포고사가 적은 것이 어느 정도 연관성이 있을 것으로 판단된다.

**결 론** : AC133 항원 표현 유무에 따른 임상적인 차이는 없었지만, AC133 항원의 세포고사를 포함하는 생물학적 특성이 다른 미성숙 세포 표면 항원과 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, AC133 항원의 예후인자로서의 유용성과 AC133 항원 양성 급성백혈병의 생물학적인 특성을 더 정확히 입증하기 위해서는 더 많은 환자를 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌


1) Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW : *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 90:5002-5012, 1997*
2) Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW : *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen : Isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 90:5013-5021, 1997*
3) Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D : *Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. Blood 93:1435-1437, 1999*
4) Buhring HJ, Seiffert M, Marxer A, Weiss B, Faul C, Kanz L, Brugger W : *AC133 antigen expression is not restricted to acute myeloid leukemia blasts but is also found on acute lymphoid leukemia blasts and on a subset of CD34+ B-cell precursors. Blood 94:832-833, 1999*
5) Myint H, Lucie NP : *The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukaemia. Leuk Lymphoma 7:425-429, 1992*
6) Raspadori D, Lauria F, Ventura MA, Rondelli D, Visani G, de Vivo A, Tura S : *Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloblastic leukemia : Analysis of 141 cases. Leuk Res 21:603-607, 1997*
7) Zochbauer S, Schwarzinger I, Strobl H, Lechner K, Pirker R : *Relationship between MDR1 gene and surface markers in acute myeloid leukemia. Anticancer Res 17:749-752, 1997*
8) Ross DD : *Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. Leukemia 14:467-473, 2000*
9) Jennings CD, Foon KA : *Recent advances in flow cytometry : Application to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood 90:2863-2892, 1997*
10) Keating MJ, Smith TL, Gehan EA, McCredie KB, Bodey GP, Spitzer G, Hersh E, Gutterman J, Freireich EJ : *Factors related to length of complete remission in adult acute leukemia. Cancer 45:2017-2029, 1980*
11) Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A : *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML : Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 92:2322-2333, 1998*
12) Callea V, Morabito F, Martino B, Stelitano C, Oliva B, Nobile F : *Diagnostic and prognostic relevance of the immunophenotype in acute myelocytic leukemia.* Tumori *77:28-31, 1991*
13) Keyhani A, Huh YO, Jendiroba D, Pagliaro L, Cortez J, Pierce S, Pearlman M, Estey E, Kantarjian H, Freireich EJ : *Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. Leuk Res 24:153-159, 2000*
14) Iijima N, Miyamura K, Itou T, Tanimoto M, Sobue R, Saito H : *Functional expression of Fas (CD95) in acute myeloid leukemia cells in the context of CD34 and CD38 expression : Possible correlation with sensitivity to chemotherapy. Blood 90:4901-4909, 1997*
15) Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, Olive D : *Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38− progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. Cancer Res 60:4403-4411, 2000*
16) Li Q, Tsuruda K, Sugahara K, Dateki N, Ohishi E, Yamada Y, Tomonaga M, Moriuchi H, Tsuji Y, Kamihira S : *Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukemia cells. Leuk Res 24:437-444, 2000*
17) Findley HW, Zhou M : *The clinical significance of Fas expression in leukemia : Questions and controversies. Leukemia 13:147-149, 1999*
18) Min YH, Lee S, Lee JW, Chong SY, Hahn JS, Ko YW : *Expression of Fas antigen in acute myeloid leukaemia is associated with therapeutic response to chemotherapy. Br J Haematol 93:928-930, 1996*
19) Lewis NR, Pallis M, Russell NH : *Fas receptor-Fas ligand system is independent of both CD34 status*

*and chemosensitivity in acute myeloid leukemia. Exp Hematol 28:535-542, 2000*

20) Campos L, Sabido O, Viallet A, Vasselon C, Guyotat D : *Expression of apoptosis-controlling proteins in acute leukemia cells. Leuk Lymphoma 33:499-509, 1999*

21) Lauria F, Raspadori D, Rondelli D, Ventura MA, Fiacchini M, Visani G, Forconi F, Tura S : *High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. Leukemia 11:2075-2078, 1997*

22) Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, Estey EH, Kantarjian HM, Andreeff M, Harris D, Van Q, Walterscheid M, Kornblau SM : *Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. Blood 92:3090-3097, 1998*

23) Datta R, Banach D, Kojima H, Talanian RV, Alnemri ES, Wong WW, Kufe DW : *Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. Blood 88:1936-1943, 1996*

24) Vial JP, Belloc F, Dumain P, Besnard S, Lacombe F, Boisseau MR, Reiffers J, Bernard P : *Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukaemic cells. Leuk Res 21:163-172, 1997*

25) Grant S : *Ara-C : Cellular and molecular pharmacology. Adv Cancer Res 72:197-233, 1998*

26) Muller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B : *Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage. Biochem Biophys Res Commun 230: 254-257, 1997*

27) Friesen C, Fulda S, Debatin KM : *Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. Leukemia 13:1854-1858, 1999*

28) Munker R, Andreeff M : *Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion (CD54) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-alpha and IFN-gamma. Cytokines Mol Ther 2:147-159, 1996*

29) Hu X, Tang M, Fisher AB, Olashaw N, Zuckerman KS : *TNF-alpha-induced growth suppression of CD34+ myeloid leukemic cell lines signals through TNF receptor type I and is associated with NF-kappa B activation. J Immunol 163:3106-3115, 1999*